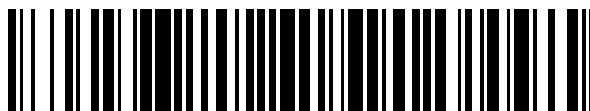


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 281**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2016** E 16000276 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018** EP 3203231

54 Título: **Método para la preparación de la analítica de muestras de origen biológico**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.11.2018

73 Titular/es:

R-BIOPHARM AKTIENGESELLSCHAFT (100.0%)
An der Neuen Bergstr. 17
64297 Darmstadt, DE

72 Inventor/es:

LACORN, MARKUS;
WINKLE, JOHANNES;
BLÖDORN, DIRK y
GARRIDO, GILBERT

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 689 281 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la preparación de la analítica de muestras de origen biológico

5 Campo de la invención

[0001] La invención se refiere a un método para la eliminación de componentes que interfieren, particularmente polifenoles y antocianinas, de una muestra por examinar de origen biológico.

Campos de aplicación son la industria alimentaria, la industria del pienso o la biotecnología

10

Antecedentes de la invención

[0002] La analítica de alimentos se ocupa del examen de la composición de alimentos y su cambio durante la fabricación, almacenamiento y preparación. Particularmente desempeñan un papel cada vez más importante la detección y determinación de sustancias causantes de alergias, dado que las alergias alimentarias e intolerancias representan un problema cada vez mayor. Así, por ejemplo, las personas con intolerancia a la histamina después del consumo de alimentos con histamina, como por ejemplo vino tinto, sufren de erupciones cutáneas, dolores de cabeza, diarrea, constipado, palpitations, náuseas o muchos otros problemas. Por ello, a los "alérgicos" a la histamina no se les recomienda el consumo de vino, especialmente vino tinto. Por proteólisis bacteriana y la tasa metabólica que sigue de histidina liberada se puede formar histamina durante el alojamiento de vino en el barril o bajo condiciones desfavorables en el depósito. Según la bibliografía la histamina está en el vino en un rango de concentración de 0 - 20 mg/l. Las concentraciones más altas se han observado en vino tinto, pero también los vinos rosados y blancos presentan regularmente pequeñas concentraciones. Como se ha mencionado al principio, hay un gran interés en examinar alimentos en cuanto a sustancias causantes de dichas alergias o intolerancias.

15

20

25

En todo caso, las muestras de partida se presentan a menudo como no adecuadas para métodos analíticos rápidos y convenientes, puesto que pueden contener posibles sustancias interferentes, que deben ser eliminadas de antemano de forma costosa.

30

[0003] Otros ámbitos importantes de la analítica de alimentos representan las investigaciones de residuos de antibióticos y hormonas. Para estas sustancias existen en parte valores límite pero también condiciones de tolerancia cero, es decir, la misma presencia incluso cuando hay concentraciones muy bajas, provoca en estos casos una falta de aptitud para de comercialización de los alimentos. Los ámbitos de medición de los métodos utilizados frecuentemente son de ng/kg y por tal motivo son sensibles a sustancias que interfieren. Como ejemplo se puede citar en este punto la determinación de la hormona artificial clenbuterol del grupo de β -agonista en piensos, hígado y orina.

35

Estado de la técnica

[0004] Hasta ahora, el contenido de histamina se determinó en muestras de vino en gran parte mediante HPLC. Los análisis de HPLC se caracterizan generalmente por un coste elevado en personal y aparatos y condicionado por ello, por un gasto elevado. Generalmente la precisión es suficiente, sin embargo, la recuperación en algunos casos no es siempre óptima. La razón es en este caso el uso de reactivos de derivación, que se deben añadir en cantidad suficiente a la muestra (extraída) y en caso de una temperatura o duración de aplicación no precisa, puede conducir a resultados demasiado poco precisos. A causa de las desventajas citadas este método no es el medio de la elección para analizar de forma rápida, sencilla y económica alimentos como muestras de vino.

40

45

[0005] Un método alternativo de fácil manejo y mucho más económico sería la determinación enzimática del contenido de histamina (p.ej. con histamina-dehidrogenasa) o la determinación enzimático-inmunológica (ELISA). Sin embargo, los ensayos realizados hasta ahora no condujeron a resultados satisfactorios. Se presume que componentes del vino como por ejemplo antocianinas y polifenoles interaccionan con los substratos en la determinación enzimática o los anticuerpos en ELISA y por consiguiente se deben eliminar antes de la analítica.

50

[0006] En el caso de clenbuterol, se usan métodos cromatográficos muy exitosos como p. ej. LC en combinación con detectores de espectrometría en masa para el examen de un uso ilegal. Estos métodos, como ya expuesto anteriormente, tanto desde el punto de vista de la maquinaria como también de los recursos humanos, son costosos y se caracterizan generalmente por gastos elevados. Por lo tanto, a menudo se intercalan métodos de cribado como ELISA, para tener que analizar solo muestras sospechosas en los métodos costosos. Estos métodos de cribado muestran a menudo efectos matriz por sustancias que interfieren específicas de matriz (p. ej. polifenoles en piensos). Como consecuencia de eso pueden obtenerse en gran medida falsos positivos en los métodos de cribado, con lo que aumenta el número de muestras para los métodos de comprobación que siguen.

55

60

[0007] En el pasado hubo algunos ensayos para eliminar polifenoles en el sentido de una preparación de ensayo con ayuda de metales pesados. Así, por ejemplo, en Annali di Chimica Applicata (1935) 25:679-684 se examinó el uso de Hg (II) para la precipitación de polifenoles. La patente US 3540455 describe la eliminación de polifenoles del tabaco con ayuda de acetato de plomo o acetato de bario. Planta Med. (1956) 2:33-40 describe la utilización

65

de Zn (II) para la eliminación de polifenoles de origen vegetal. Sin embargo, por motivos medioambientales, Pb y Hg, siempre que sea posible, ya no se aplican en la analítica moderna.

[0008] CN 101054370, Cheng et al. 2006 (Yingyong Huagong (2006), 35 (4): 259-262) o Cheng et al. 2007 (Fujian Shifan Daxue Xuebao, Ziran Kexueban (2007), 23 (1): 105-108) describen la preparación de complejos de te-polifeno-lantano. Objetivo de estos documentos es examinar el efecto antimicrobiano saludable y antioxidante de polifenoles de té verde en los complejos de tierra en el polifenol que es escaso. La utilización de tierras raras se realiza, sin embargo, no para la eliminación cuantitativa de polifenoles en el sentido de una preparación de muestra para una analítica sucesiva.

[0009] Lacorn et al. (BIO Web of Conferences (2015) vol. 5, pág. 02019) divulga un lote de ensayo para retirar polifenoles y antocianinas del vino con cuantificación sucesiva de histamina, sin entrar en la composición precisa de los reactivos y el principio de funcionamiento.

[0010] Tschopp W. (Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie (1936) 244: 59-77) describe la utilización de Hg(II)-acetato para retirar sustancias que interfieren, que se reducen, de la orina. La retirada de estas sustancias que interfieren sirve para la preparación de muestras para la cuantificación de ácido ascórbico en la orina, que se clasifica de forma resumida por el autor como no adecuado. En un subcapítulo se menciona el uso de Pb(II)-acetato, pero este en seguida se representa como inadecuado, porque el analito ácido ascórbico se precipita conjuntamente.

[0011] En Keil et al. (Electr. Micros. of Model Systems; III. Methods, 1(2010): 363-394) se discuten las características de precipitación de lantano. De esta manera se precipita la sal lantánida trivalente soluble de tampón de fosfato.

Objetivo y tarea de la invención

[0012] La invención tiene el objetivo de preparar muestras de origen biológico para la analítica - p. ej. para analítica enzimática, analítica inmuno-turbimétrica, sistemas basados en anticuerpos, como sistemas de flujo lateral y ELISA, estudio de microfluidos o métodos de cromatografía de tal manera, que se garantiza un análisis exacto. De ahí se deduce la tarea de la presente invención de mejorar la analítica de muestras de tal manera que la analítica elimine sustancias molestas de antemano y de esta manera se eliminen fuentes de error en la analítica sucesiva. Particularmente se deduce de esta manera la tarea de eliminar de muestras de origen biológico de manera efectiva y económica antocianinas y/o polifenoles que interfieren pero también otras sustancias estructuralmente similares.

[0013] Esta tarea se resuelve a través de un método según la reivindicación 1. Otras formas de realización posibles resultan de las reivindicaciones secundarias, la descripción y los ejemplos.

Esencia de la invención

[0014] Sorprendentemente se descubrió que con ayuda de sales hidrosolubles de lantánidos trivalentes como p. ej. cerio (iii) o lantano (iii) se pueden eliminar sustancias interferentes de muestras de vino y de esta manera se puede realizar a continuación una determinación enzimática o inmunológica de la concentración de histamina. Investigaciones sucesivas mostraron que estas sustancias interferentes son polifenoles y antocianos o sustancias estructuralmente similares que se precipitan por los iones metálicos polivalentes.

[0015] El método según la invención se caracteriza por el hecho de que se usan sales hidrosolubles de lantanos trivalentes para el precipitado de polifenoles y/o antocianinas de muestras biológicas.

[0016] Se mostró que el valor del ph y la concentración del catión polivalente tienen una gran influencia sobre la reacción de precipitación. De esta manera se consiguen resultados óptimos usando La (III) y tampón de 0.325 M, mientras que para Yb (III) solo se consiguen resultados óptimos usando un tampón de 0.3 M.

[0017] Otros iones metálicos trivalentes como p. ej. Y (III), Al (III) e In (III), si bien es cierto que pueden descolorar vino tinto completamente, muestran al aplicarse en el sistema analítico p. ej. la analítica enzimática, problemas en cuanto a recuperarlos. No obstante, es concebible llegar aquí también a recuperaciones cuantitativas a través de la adaptación de las concentraciones a reacciones de precipitación.

[0018] Además, se mostró que seguidamente después de la reacción de precipitación, usando sales hidrosolubles de lantánidos trivalentes, es esencial un tratamiento de la prolongación con tampones idóneos como por ejemplo tampones de fosfato, sulfato y oxalato en tanto en cuanto se precipitan de esta manera lantánidos trivalentes excedentes, sin interferir en la analítica sucesiva.

[0019] El sobrenadante resultante se usa a continuación para la analítica como por ejemplo la determinación enzimática, enzimoimmunológica o cromatográfica líquida del contenido de histamina o contenido de clenbuterol.

[0020] La invención se explica más detalladamente a continuación con base en la determinación de la concentración de histamina en vinos. Se desarrolló un método de extracción para todos los tipos de vinos, con el que se pueden eliminar polifenoles y antocianinas y de esta manera se permita a continuación la determinación enzimática de la concentración de histamina de estas muestras de vino.

5

[0021] Un planteamiento típico es la reacción de precipitación con lantano (III) como sal hidrosoluble de lantánido trivalente: A continuación se expone como ejemplo un planteamiento preferido para el procesamiento del vino y la determinación enzimática sucesiva del contenido de histamina.

10 [0022] Pero también posible examinar otras muestras de origen biológico como por ejemplo pienso, hígado, levadura, sangre u orina.

Ejemplo

15 [0023]
200 µl de muestra (p. ej. vino tinto, vino rosado o vino blanco)
200 µl tampón tris (0,325 m, pH 9,0)
200 µl LaNO₃ (0,1 M)

20 Agitar
incubación durante 5 min. a temperatura ambiente
centrifugado (14 000 g, 2 min)
retirada de 500 µl de sobrenadante
100 µl de tampón de Na-fosfato (0,5 m, pH 7,0)

25 Agitar
Incubar 5 min. a temperatura ambiente
centrifugado (14 000 g, 2 min)

30 [0024] El último paso del centrifugado para la separación de la precipitación se puede sustituir también por métodos de filtración o de sedimentación.

[0025] El sobrenadante se puede usar ahora para la analítica sucesiva como por ejemplo la determinación enzimática del contenido de histamina de la muestra de partida. A continuación se expone un planteamiento típico de una determinación de histamina enzimática aplicando el kit de prueba comercial RIDASCREEN® Histamine (enzimático) de la compañía R-Biopharm (catálogo Nr. R1605) (otras informaciones se exponen bajo el Ejemplo 3):

35 150 µl de tampón tris (0.325 m, pH 9)
Mezclar con 100 µl de muestra o calibrador
agitar manualmente con cuidado
3 min. de incubación a temperatura ambiente
40 Medición de extinción A1 a 450 nm
Añadir 10 µl de histamina deshidrogenasa
Agitar manualmente con cuidado.
10 min. de incubación a temperatura ambiente

45 [0026] Medir absorbancia A2 a 450 nm.
Bajo consideración del factor de dilución medir las concentraciones de las muestras con ayuda de la curva estándar creada.

50 [0027] Para la comprobación de la efectividad de la precipitación de sustancias interferentes con ayuda de sales hidrosolubles de lantánidos trivalentes se realizaron mediciones comparativas entre HPLC y análisis enzimático. Fueron examinados 23 vinos tintos diferentes. Los resultados en la figura 1 muestran la capacidad de comparación muy buena de ambos métodos. Los datos brutos correspondientes están expuestos en la tabla 1 que sigue.

Tabla 1: Investigaciones de comparación HPLC vs. Análisis enzimático

55

Muestra de vino	Contenido de histamina después de la precipitación de polifenoles y antocianinas (determinado enzimáticamente)	Determinación del contenido de histamina por medio de HPLC
	mg/L	mg/L
Vino tinto D. O. Almansa	2,63	3,10
Vino tinto D.O. Rioja	5,21	6,00
Vino tinto D. O. Ribera del Duero	6,27	6,80
Vino tinto D. O. Vinos de Madrid	3,93	5,10
Vino tinto D. O. Ribera del Duero	3,23	4,80

Vino tinto D. O. Ribera del Duero	3,28	3,60
Vino tinto Tierra de Castilla	<1,4	3,60
Vino tinto Tierra de Castilla	<1,4	1,00
Vino tinto D. O. Vinos de Madrid	5,31	5,40
Vino tinto D. O. Navarra	5,11	5,90
Vino tinto D. O. Navarra	<1,4	<0,5
Vino tinto D. O. Navarra	<1,4	<0,5
Vino tinto D. O. Penedés	7,80	8,90
Vino tinto D. O. Vinos de Madrid	1,97	1,90
Vino tinto D. O. Vinos de Madrid	1,75	1,40
Vino tinto D.O. Rioja	5,17	5,40
Vino tinto D.O. Rioja	6,03	6,60
vino tinto NRL PT 2013	4,97	5,23
vino tinto NRL PT 2014	9,86	10,26
Vino tinto D. O. Navarra añadido 5 mg/l	4,33	5,30
Vino tinto D. O. Navarra añadido 10 mg/l	9,11	10,30
Vino tinto D. O. Navarra añadido 5 mg/l	4,18	5,50
Vino tinto D. O. Navarra añadido 10 mg/l	9,11	10,20
Vino tinto Rioja	8,59	10,20
Vino tinto Rioja	6,70	6,70
Vino tinto Castilla	3,60	3,60
Vino tinto Chianti	2,09	2,80
Vino tinto California	1,14	<0,5

[0028] A partir de exámenes previos quedó claro que el volumen del tampón tris (0.325 m Tris, pH 9.0) puede ser crítico. El volumen de LaNO₃ (0.1 M) y del tampón de Na-fosfato (0.5 m, pH 7.0) no presentan problemas. Por lo tanto se modificó el volumen del tampón tris (0.325 m, pH 9.0) +/- 20% y se examinaron las repercusiones sobre un vino tinto enriquecido y un vino blanco enriquecido (especie: Weißherbst). Al aumentar el volumen del tampón tris en el vino tinto, se observó un aumento de la concentración de histamina. Al contrario, en el vino Weißherbst se observó exactamente el efecto inverso (tabla 2). De esto se pudo deducir que 200 µl de tampón tris se podía considerar como suficientemente robusto.

10 Tabla 2: Influencia de la variación del volumen del tampón tris (0,325 m, pH 9,0) sobre el resultado de medición de histamina; la solución de LaNO₃ es 0,1 M, tampón de fosfato 0,5 M (pH 7.0)

	Tampón tris µl	LaNO ₃ µl	tampón de fosfato µl	contenido de histamina mg/l
Dornfeld	240	200	100	11,65
Vino tinto	220	200	100	10,66
añadido a 10 mg/l	200	200	100	10,62
	180	200	100	10,26
	160	200	100	10,16
Spätburgunder	240	200	100	10,88
Weißherbst	220	200	100	11,01
Añadido a 10 mg/l	200	200	100	11,23
SO ₂ > 260 mg/l	180	200	100	11,33
	160	200	100	11,83

15 [0029] Como ya representado, el método según la invención se puede usar por ejemplo para el procesamiento de vino blanco, rosado y tinto con determinación enzimática sucesiva de la concentración de histamina. El LoD (Límite de Detección) calculado es 0.54 mg/l. Las muestras presentan en esta zona una precisión suficiente (VK<20%). El LoQ (Límite de Cuantificación) (1.44 mg/l) se confirmó a través de experimentos de adición: se pudo conseguir una recuperación de 95% con una desviación típica relativa de 3.5%.

20 La desviación típica de reproducción se encuentra independientemente de la concentración en 0.12 mg/l. Por el análisis de 20 muestras de vino se pudo calcular un intervalo de fidelidad del 95% de 84 - 114 % de recuperación.

25 [0030] Las pruebas de estabilidad muestran una estabilidad muy alta e insensibilidad de los reactivos supresores de interferencias y de precipitado al transporte y condiciones de carga, como temperaturas altas o bajas. Investigaciones (tabla 3) realizadas hasta ahora muestran una conservación a temperaturas de 4°C o 45°C de 27 semanas (aproximadamente 7 meses).

Tabla 3: Medición de un vino tinto puro o un vino tinto enriquecido (10 mg/l) en tres lotes diferentes de los reactivos supresores de interferencias después de almacenamiento de los reactivos a 4 °C, Temperatura ambiente (RT, referencia) y 45°C.

Lote	Semana	4°C		RT		45°C	
		puro mg/l	+ 10 mg/l mg/l	puro mg/l	+ 10 mg/l mg/l	puro mg/l	+ 10 mg/l mg/l
1	27	0,72	10,2	0,75	10,4	0,82	10,3
		0,72	10,5	0,68	10,1	0,82	10,3
2	27	0,61	10,3	0,72	10,1	0,68	10,4
		0,61	10,0	0,61	10,2	0,72	10,2
3	27	0,72	10,3	0,75	10,5	0,82	10,4
		0,64	10,1	0,68	10,1	0,82	10,4

5 [0031] En el caso de someter a los reactivos a una estabilidad de transporte simulada (6 h ligeramente sobre el agitador horizontal, al comienzo 400/min, después a 150/min, a continuación 17 h a 4°C; nuevamente 6 h el agitador horizontal a 150/min; conservar 17 h a 45°C; después 31 h a 4°C; otro alojamiento a más largo plazo a temperatura ambiente), entonces los reactivos 6 meses después de esta estabilidad de transporte simulada se muestran como estables (tabla 4).

Tabla 4: Medición de un vino tinto puro o un vino tinto enriquecido (10 mg/l) en tres lotes diferentes de la reacción de supresión de interferencias 6 meses después de realizar una estabilidad de transporte simulada.

Lote	Puro mg/l	+ 10 mg/l mg/l
1	0,97	11,4
	0,94	11,19
2	0,8	10,49
	0,83	10,46
3	0,94	10,56
	0,83	10,42

15 [0032] En el caso de que los reactivos se congelen dos veces seguidas durante toda la noche a -20°C, después de un almacenamiento durante 6 meses a temperatura ambiente se presentan igualmente como estables (tabla 5).

20 Tabla 5: Medición de un vino tinto puro o un vino tinto enriquecido (10 mg/l) en tres lotes diferentes de los reactivos de supresión de interferencias 6 meses después de la congelación dos veces a -20°C.

Lote	Puro mg/l	+ 10 mg/l mg/l
1	0,94	11,05
	0,94	10,91
2	0,80	10,98
	0,80	10,42
3	0,90	11,05
	0,87	11,16

25 [0033] Las muestras extraídas se pueden almacenar hasta el 2 días a 4°C o 1 día a 20-25 °C.

30 Extractos de vinos con concentraciones de histamina fuera del ámbito de calibración se pueden diluir con agua. El sistema reacciona de forma fuerte a una variación de los tiempos de incubación o una omisión de la mezcla mediante un agitador. El método según la invención se caracteriza por una desviación estándar relativa menor al 4 % para concentraciones por encima de LoQ. El método, por consiguiente, en caso de que se realice correctamente, se considera como muy preciso. En caso de que se usen otros lantánidos en lugar de La (III), se consiguen excelentes recuperaciones en todos los casos adaptando levemente la dureza del tampón (tabla 6).

Tabla 6: Examen de otros lantánidos sobre la aplicabilidad para la eliminación de sustancias interferentes

Lantánido (valencia)	Lantánido (mol/l)	Tris pH 9.0 mol/l	Histamina		
			Vino tinto, puro (mg/l)	Vino tinto, +10 mg/l (mg/L)	Recuperación (%)
Ce (III)	0,1	0,325	< LoQ	10,21	102
Pr (III)	0,1	0,325	< LoQ	9,92	99
Nd (III)	0,1	0,325	< LoQ	9,72	97
Sm (III)	0,1	0,3	< LoQ	9,61	96
Gd (III)	0,1	0,3	< LoQ	9,46	95
Dy (III)	0,1	0,3	< LoQ	9,36	94

Er (III)	0,1	0,3	< LoQ	9,94	99
Yb (III)	0,1	0,3	< LoQ	9,23	92

[0034] La invención no es solo adecuada especialmente para eliminar sustancias interferentes en el vino y realizar a continuación una determinación enzimática de histamina. Tiene además el potencial importante de descolorar vino tinto y así poner a disposición a esta matriz a la analítica de manera sencilla y rápida para otros métodos de análisis como HPLC o determinaciones de flujo lateral. En el caso de otras matrices problemáticas como p. ej. orina, hígados y sangre, existe igualmente la posibilidad de poner a disposición de manera más eficaz y sencilla que actualmente, una preparación de muestras para un gran número de diferentes métodos de análisis.

[0035] La invención se explica más detalladamente a continuación con ejemplos de realización.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1:

Precipitación de polifenoles y antocianinas a partir de muestras de vino

[0036]

1. presentar 200 µl de vino en 2 mL de recipiente eppendorf; preenjuague de la punta de pipeta
2. añadir 200 µl de reactivo 1 (0,325 M Tris, pH 9.0)
3. añadir 200 µl de reactivo 2 (0.1 M LaNO₃ en agua), agitar y a continuación 5 min de incubación con RT
4. centrifugar 2 min a 14000 g y temperatura ambiente
5. transferir 500 µl de sobrenadante a recipiente eppendorf nuevo
6. añadir 100 µl de reactivo 3 (0.5 m tampón de fosfato, pH 7.0), agitar y a continuación incubar 5 min. con RT
7. centrifugar 2 min a 14000 g y temperatura ambiente
8. introducir 100 µl del sobrenadante claro en la prueba enzimática en n=2. Condicionado por la elaboración de la muestra de vino, para el cálculo posterior de la concentración de histamina se tiene que considerar un factor de dilución de 3,6.

Ejemplo 2:

[0037] Los volúmenes expuestos en el Ejemplo 1 se pueden variar discrecionalmente entre sí manteniendo las proporciones. Se puede modificar también la velocidad de centrifugación. Por tanto, también el planteamiento que sigue es funcional.

1. presentar 2 mL vino en tubito de plástico de 10 mL; preenjuague de punta de pipeta
2. añadir 2 mL reactivo 1 (0,325 M Tris, pH 9,0)
3. añadir 2 mL reactivo 2 (0.1 M La(NO₃)₃ en agua), agitar y a continuación incubar 5 min con RT
4. centrifugar 2 min a 4000 g y temperatura ambiente
5. transferir 5 mL de sobrenadante a recipiente eppendorf nuevo
6. añadir 1 mL de reactivo 3 (0.5 m de tampón de fosfato, pH 7.0), agitar y a continuación incubar 5 min con RT
7. centrifugar 2 min a 4000 g y temperatura ambiente
8. introducir 100 µl del sobrenadante claro en la prueba enzimática en n=2

Ejemplo 3:

[0038] Determinación de la concentración de histamina bajo aplicación de un kit de ensayo comercial, p. ej. RIDASCREEN® Histamin (enzymatic) de la compañía R-Biopharm (catálogo nº. R1605).

[0039] Calentar todos los reactivos necesarios para la determinación enzimática a temperatura ambiente (20 - 25 °C) y mezclar cuidadosamente antes del uso.

1. Una placa de microtítulo se revistió con un transmisor de electrones comercial (20 mg/l) y un substrato idóneo (250 mg/l), que cambia el color al transmitir electrones
2. introducción de 150 µl de reactivo 1 (0.05 M tampón tris, pH 9) en cada una de las cavidades correspondientes de la placa de microtítulo y agitar manualmente la placa con cuidado
3. introducir en pipetas 100 µl de las soluciones estándar, de los controles o de las muestras preparadas del ejemplo 1 en determinación doble. Las puntas de pipetas se preenjuagan. A continuación se agita manualmente con cuidado la placa.
4. Después de 3 min. de incubación a temperatura ambiente, se mide la absorbancia A₁ a 450 nm sin filtro de longitud de onda de referencia. En el caso de que en este tiempo se observe un color amarillento en aumento en el pocillo, entonces se debería comprobar un contenido de ácido ascórbico en el vino inferior a 250 mg/l. En el caso de que se encuentre un vino blanco con mucha acidez sin ácido ascórbico, entonces el tiempo de incubación se debería aumentar a 10 min.
5. 10 µl de una histamina deshidrogenasa comercial (20 u/ml) se introducen en cada cavidad.

A continuación se agita manualmente con cuidado la placa.

6. Después de 10 min. de incubación a temperatura ambiente, medir la absorbancia A2 a 450 nm sin filtro de longitud onda de referencia.

7. Calcular las concentraciones de las muestras considerando el factor de dilución.

5

Ejemplo 4:

Examen del contenido de histamina de muestras de vino habituales

10 [0040] Se adquirieron 20 muestras de vino diferentes en el comercio, se procesaron según el Ejemplo de realización 1 y de acuerdo con el Ejemplo de realización 3 se determinaron enzimáticamente las concentraciones de histamina. Casi todos los vinos presentaban concentraciones inferiores a 5 mg/l. Las concentraciones marcadas en cursiva fueron extrapoladas (valor bajo LoQ). Únicamente un vino tinto portugués almacenado relativamente mucho tiempo, muestra niveles de residuos de alrededor de 10 mg/l (tabla 7).

15

Tabla 7: Contenido de histamina de vinos comerciales

País	Región	Año	Tipo	Especie	mg/l
DE	Rheinhessen	2013	Müller-Thurgau	blanco	0,5
HU	Felső-Magyarország	2013	Grüner Veltliner	blanco	0,4
DE	Rheingau	2014	Riesling	blanco	1,2
IT	Trentino	2013	Cuvee	rosado	0,3
IT	Bardolino	2013	Cuvee	rosado	0,4
DE	Rheingau	2013	Pinot noir	rosado	0,4
DE	Rheingau	2014	Pinot Noir	tinto	0,0
DE	Rheingau	2012	Cuvee	tinto	0,2
DE	Rheinhessen	2011	Pinot noir	tinto	0,2
IT	Piemonte	2013	Barbera D'asti	rojo	0,4
DE	Rheinhessen	2014	Dornfelder	tinto	0,5
ES	Rioja	2006	Cuvee	tinto	0,6
FR	Bordeaux	2013	Cuvee	tinto	0,6
FR	Cotes Du Rhone	2013	Grenache-Syrah	tinto	0,9
PT	Alentejano	2009	Cuvee	tinto	2,2
IT	Sicily	2013	Nero D'Avola	tinto	2,4
IT	Sicily	2013	Nero D'Avola-Merlot	tinto	4,1
ES	Ribera de Duero	2011	Tempranillo	tinto	4,5
IT	Umbria	2010	Cuvee	D'Avola	4,8
IT	Trentino	2012	Merlot	tinto	5,5
PT	Duoro	2009	Cuvee	tinto	10,7

Ejemplo 5:

20

Dilución del extracto de una muestra de vino de alta concentración

[0041] Una muestra de vino tinto Dornfeld se coloca sobre 200 mg/l de histamina y se elabora. A continuación este extracto se diluye con agua para cubrir la zona de medición total.

25 Estas soluciones de medición se miden en el ensayo enzimático. El sistema enzimático se examinó para otras validaciones en cuanto a su linealidad. Este examen dio como resultado una linealidad de hasta aproximadamente 25 mg/l en la solución de medición. Al comparar con los datos en la tabla 6 se puede mantener esta reivindicación de linealidad. A partir de aproximadamente 30 mg/l de histamina en la solución de medición se tiene que contar con

30 concentraciones mucho más bajas. En la figura 2 se muestra una evaluación gráfica de los datos de la tabla 8. En la zona de medición validada de aproximadamente 1 hasta 20 mg/l se encuentra por consiguiente una dilución de los extractos.

Tabla 8: Dilución de la solución de medición

35

Vino mg/l	Solución de medición mg/l	Coefficiente dilución	Vino mg/l
200	39,8	3,6	143,1
	39,7	4	158,8

38.3	4,5	172,4
35.7	5,14	183,3
32.3	6	193,6
28.2	7,2	203,3
23.1	9	207,5
17.7	12	212,2
11.7	18	211,0
5,75	36	207,0
2,95	72	212,4

Ejemplo 6:

Influencia de diferentes tiempos de incubación

5

[0042] Se examinó la influencia de tiempos de incubación diferentes en la elaboración de muestras. Se variaron los tiempos de incubación del ejemplo 1 después de la adición del tampón tris (condiciones de incubación 1) y después de la adición del tampón de Na-fosfato (incubación 2) y se examinó la influencia sobre el contenido de histamina determinado a continuación (tabla 9).

10

Tabla 9: Influencia de los tiempos de incubación sobre el resultado de medición de histamina de una muestra de vino tinto enriquecida (Dornfelder)

Incubación 1 min	Incubación 2 min	Contenido mg/l
4	4	10,75
4	5	10,57
4	20	10,49
5	4	11,91
5	5	10,68
5	20	10,64
20	4	11,54
20	5	10,49
20	20	10,42

15

[0043] Los resultados en la tabla 9 muestran claramente que no es observable ningún efecto. Los tiempos de incubación se pueden considerar de modo robusto y con respectivamente 5 min se pueden considerar respectivamente suficientes.

Ejemplo 7:

20

[0044] Determinación de la concentración de Clenbuterol aplicando un kit de ensayo comercial, p. ej. RIDASCREEN® Clenbuterol de la compañía R-Biopharm (catálogo n°. R1711).

25

[0045] Todos los reactivos necesarios para la determinación enzimática se calientan a temperatura ambiente (20 - 25 °C) y se mezclan con cuidado antes del uso.

30

1. Una placa de microtítulo se revistió con anticuerpos específicos dirigidos contra clenbuterol (la cantidad de revestimiento depende del lote de anticuerpo y de las características del conjugado clenbuterol-enzimas utilizado, pero la mayoría de las veces se encuentra en el área de 1 µg por cavidad de la placa de microtítulo)

2. 50 µl de solución estándar o de prueba extraída se introducen en las cavidades de las placas de microtítulo

3. Incubación durante 30 min a temperatura ambiente a oscuras y lavar minuciosamente tres veces a continuación con 250 µl de tampón PBS/Tween cada vez; sacudir enérgicamente entre cada paso de lavado y al final sobre paños de laboratorio absorbentes

35

4. Pipetear en las cavidades respectivamente 50 µl del conjugado de clenbuterol-enzima (la cantidad del conjugado es específica de la carga y depende de la cantidad de anticuerpo por cavidad)

5. Incubar durante 15 min. a temperatura ambiente a oscuras y a continuación lavar minuciosamente tres veces respectivamente con 250 µl de un tampón de PBS/Tween; entre cada paso de lavado y al final sacudir enérgicamente sobre paños de laboratorio absorbentes

40

6. pipetear respectivamente 100 µl de solución de sustrato (tetrametil bencidina/H₂O₂ en las concentraciones habituales), pipetear en las cavidades, incubar durante 15 min. a temperatura ambiente en la oscuridad y a continuación detener la reacción con 100 µl 1 N H₂SO₄

7. la medición se realiza en fotómetros de placas de microtítulo a 450 nm

8. la determinación de la concentración de las muestras se realiza usando los valores de la curva estándar; se deben tener en cuenta antes de la medición los factores de dilución condicionados por la extracción de las muestras

45

Ejemplo 8:

Precipitación de polifenoles de muestras de orina

[0046] Condicionadas por los altos niveles de residuos de polifenoles en los piensos, las muestras de orina de cerdos y ganado bovino muestran durante el uso en sistemas enzimoimmunológicos efectos de matriz, que provocan una mala recuperación de clenbuterol.

Para la reducción de este efecto antes de la determinación del contenido de clenbuterol se procedió del siguiente modo:

- añadir 300 µl de muestra de orina con 300 µl 0.1 M $\text{La}(\text{NO}_3)_3$
- mezclar, incubar 5 min. con RT, después, centrifugar 2 min. a 14000 g
- retirar 300 µl del sobrenadante y sustituir con 150 µl 0.5 M del tampón de fosfato
- mezclar, incubar 5 min a RT y centrifugar 2 min. a 14000 g

Tabla 10: Medición paralela de 3 muestras de orina bovina y 4 muestras de orina porcina después del procesamiento mediante el precipitado de lantánidos o uso directo de la orina después de la dilución con tampones de prueba; dado que las orinas ya presentan un valor de ph óptimo para el precipitado, se puede renunciar a un ajuste del valor pH mediante tampones tris; como nivel de añadido se eligió 0.5 µg/kg.

Orina	con precipitación WF (%)	sin precipitación WF (%)
Vaca 2045-20	82%	47%
Vaca 2240-6	104%	52%
Vaca 2240-7	84%	55%
Cerdo 2236-9	80%	66%
Cerdo 2236-11	93%	56%
Cerdo FEVal 12	100%	59%
Cerdo FEVal 18	92%	44%

[0047] Los resultados de la tabla 10 muestran la aptitud excelente del precipitado para la preparación de muestras de orina en la medición de clenbuterol mediante ELISA.

Ejemplo 9:

Precipitación de clases de sustancia de leche asociadas al polifenol

[0048] Aunque es cierto que la leche no presenta niveles significativos de polifenoles, no obstante contiene también clases de sustancias que se pueden retirar por precipitación por sales hidrosolubles de los lantánidos trivalentes. Sin esta eliminación se hace difícil la recuperación en el sistema enzimoimmunológico secundario. Para eliminar este efecto antes de determinar el contenido de clenbuterol se procedió del siguiente modo:

- añadir 300 µl de muestra de leche a 300 µl 0.1 M $\text{La}(\text{NO}_3)_3$
- mezclar, incubar 5 min. con RT, luego centrifugar 2 min. a 14000 g
- retirar 300 µl del sobrenadante y sustituir con 150 µl 0.5 m de tampón de fosfato
- mezclar, incubar 5 min. con RT y centrifugar 2 min. a 14000 g

Tabla 11: Medición paralela de 6 muestras diferentes de leche después del procesamiento mediante precipitación de lantánidos o uso directo de la leche después de la dilución con tampones de prueba; dado que las muestras de leche ya presentan un valor óptimo de ph para la precipitación, se puede renunciar a un ajuste del valor de pH mediante tampones tris; como nivel de añadido se eligió 0.5 µg/L.

Leche	con precipitación WF (%)	sin precipitación WF (%)
31.08.2015	85%	72%
01.09.2015	84%	62%
FEVal 1	111%	69%
FEVal 2	100%	81%
FEVal 11	82%	73%
FEVal 12	84%	65%

[0049] Los resultados en tabla 11 muestran la excelente aptitud del precipitado para la preparación de muestras de leche en la medición de clenbuterol mediante ELISA.

[0050] El pienso bovino y porcino contiene cantidades altas de polifenoles y muestran después de la extracción sencilla del disolvente en sistemas enzimoimmunológicos efectos de matriz, que pueden dar como resultado un falso positivo y aumentar de este modo, condicionados por ello, el límite de detección del método analítico utilizado. Para la reducción de este efecto, antes de determinar el contenido de clenbuterol se procedió del modo siguiente:

- añadir 2 g de pienso a 5 ml 50 % acetonitrilo y agitar durante 20 min

- incubar 10 min sobre hielo y a continuación centrifugar a 14000 g 2 min.
- mezclar 150 µL del sobrenadante claro con 300 µL 0,325 M de tampón tris y 200 µL 0,1 M de solución de La(NO₃)₃
- incubar 5 min a temperatura ambiente; a continuación centrifugar a 14000 g durante 2 min.
- añadir 100 µL 0,5 M de tampón de fosfato, mezclar, incubar 5 min. a temperatura ambiente y a continuación centrifugación a 14000 g durante 2 min.

[0051] El procesamiento estándar mediante extracción de disolvente es como sigue:

- añadir 1 g de pienso a 3 mL de acetonitrilo y agitar 20 min
- evaporar 2 mL del sobrenadante y resuspender en 3 mL de n-Hexano
- añadir 1mL de tampón de lavado (del ELISA usado)
- agitar durante 20 min. y aplicar a continuación la fase acuosa inferior en el ensayo

Tabla 12: Medición paralela de diferentes piensos para ganado bovino y porcino después del procesamiento mediante precipitación de lantánidos o extracción del pienso con ayuda de una extracción de acetonitrilo; como nivel de añadido se eligió 0.85 µg/kg.

Pienso	Sin precipitación WF (%)	con precipitación WF (%)
Cerdo (pienso)	12%	104%
Bovino (leche)	42%	96%
Ternero	21%	83%
Cerdo (hembras)	17%	84%
Bovino (pienso)	28%	95%

[0052] Los resultados en la tabla 12 muestran la excelente aptitud del precipitado para la preparación de muestras de piensos en la medición de clenbuterol mediante ELISA.

Ejemplo 11:

Precipitación de clases de sustancias similares a polifenol a partir de hígado

[0053] Aunque es cierto que los hígados de cerdos y vacas no presentan niveles significativos de polifenoles, sin embargo contienen también evidentemente clases de sustancias, que se pueden eliminar a través de sales hidrosolubles de lantánidos trivalentes por precipitado. Sin esta eliminación difícilmente hay recuperaciones en el sistema inmunológico enzimático secundario.

Para la eliminación de este efecto antes de la determinación del contenido clenbuterol se procedió del siguiente modo:

- Añadir 2 g hígado a 3 ml 80 % acetonitrilo y agitar
- Incubar 15 min sobre hielo y centrifugar a continuación a 10 °C 10 min. separación por centrifugación
- Mezclar 100 µL del sobrenadante con 300 µL 0.08 M de tampón tris pH 9.0
- Añadir 100 µl 0.1 m La(NO₃)₃
- Mezclar, incubar 5 min. con RT y centrifugar 2 min. a 14000 g
- Retirar 400 µl del sobrenadante y añadir 50 µL 0.5 M tampón de fosfato
- Mezclar, incubar 5 min. con RT y centrifugar 2 min. a 14000 g

[0054] El procesamiento estándar mediante extracción de disolvente es como sigue:

- añadir 3 g hígado a 8 mL acetonitrilo y 1 mL de etilacetato
- agitar 30 min. y a continuación centrifugar a 4000 g 10 min.
- evaporar 4 ml de sobrenadante vaporizan y absorberlo en 2 mL de tampón de ensayo

Tabla 13: medición paralela de hígado (cerdo y vaca) después del procesamiento mediante precipitación de lantánidos o extracción de los hígados con ayuda de una mezcla de acetonitrilo-etilacetato; como nivel de añadido se eligió 5 µg/kg.

Hígado	con precipitación WF (%)	sin precipitación WF (%)
RL14-#1	79%	26%
2312-2	100%	42%
2312-4	105%	31%
SL14-#4	76%	36%

[0055] Los resultados de la tabla 13 muestran la aptitud excelente del precipitado para la preparación de muestras de hígados en la medición de clenbuterol mediante ELISA.

Ejemplo 12:

Precipitación de clases de sustancias de sangre similares al polifenol

[0056] A causa de la gran eficacia de los reactivos de precipitación que contienen lantánidos en la leche (ejemplo 8) e hígado (ejemplo 9), se puede inferir que al utilizar sangre se pueden precipitar las sustancias interferentes y este efecto se puede aprovechar analíticamente.

Ejemplo 13:

Precipitación de polifenoles y antocianinas con ayuda de Cerio (III)

[0057]

1. presentar 200 µL de vino en recipiente Eppendorf de 2 mL
2. añadir 200 µL de reactivo 1 (0,325 M Tris, pH 9,0)
3. añadir 200 µL de reactivo 2 (0.1 M Ce(NO₃)₃ en agua), agitar y a continuación incubar 5 min. con RT
4. centrifugar 2 min. a 14000 g y a temperatura ambiente
5. transferir 500 µL de sobrenadante a recipiente Eppendorf
6. añadir 100 µL de reactivo 3 (0.5 M tampón de fosfato, pH 7.0), agitar y a continuación incubar 5 min. con RT
7. centrifugar 2 min a 14000 g y temperatura ambiente
8. introducir 100 µL del sobrenadante claro en la prueba enzimática n=2

Ejemplo 14:

Precipitación de polifenoles y antocianinas con ayuda de praseodimio (III)

[0058]

1. presentar 200 µL de vino en recipiente Eppendorf de 2 mL
2. añadir 200 µL de reactivo 1 (0,325 M Tris, pH 9.0)
3. añadir 200 µL de reactivo 2 (0.1 M Pr(NO₃)₃ en agua), agitar y a continuación incubar 5 min. con RT
4. centrifugar 2 min. a 14000 g y temperatura ambiente
5. transferir 500 µL de sobrenadante a recipiente nuevo Eppendorf
6. añadir 100 µL de reactivo 3 (0.5 M tampón de fosfato, pH 7.0), agitar y a continuación incubar 5 min. con RT
7. centrifugar 2 min. a 14000 g y temperatura ambiente
8. introducir 100 µL de sobrenadante claro en la prueba enzimática n=2

Ejemplo 15:

Precipitación de polifenoles y antocianinas con ayuda de neodimio (III)

[0059]

1. presentar 200 µL de vino en recipiente Eppendorf de 2 mL
2. añadir 200 µL de reactivo 1 (0,325 M Tris, pH 9.0)
3. añadir 200 µL de reactivo 2 (0.1 M Nd(NO₃)₃ en agua), agitar y a continuación incubar 5 min. con RT
4. centrifugar 2 min. a 14000 g y a temperatura ambiente
5. transferir 500 µL de sobrenadante a recipiente nuevo Eppendorf
6. añadir 100 µL de reactivo 3 (0.5 M tampón de fosfato, pH 7.0), agitar y a continuación incubar 5 min. con RT
7. centrifugar 2 min. a 14000 g y temperatura ambiente
8. introducir 100 µL de sobrenadante claro en la prueba enzimática n=2

Ejemplo 16:

Precipitación de polifenoles y antocianinas con ayuda de Samario (III)

[0060]

9. presentar 200 µL de vino en recipiente Eppendorf de 2 mL
10. añadir 200 µL de reactivo 1 (0,3 M Tris, pH 9.0)
11. añadir 200 µL de reactivo 2 (0.1 M Sm(NO₃)₃ en agua), agitar y a continuación incubar 5 min. con RT
12. centrifugar 2 min. a 14000 g y centrifugar a temperatura ambiente
13. transferir 500 µL de sobrenadante a recipiente Eppendorf
14. añadir 100 µL de reactivo 3 (0.5 M tampón de fosfato, pH 7.0), agitar y a continuación incubar 5 min. con RT
15. centrifugar 2 min. a 14000 g y a temperatura ambiente
16. introducir 100 µL del sobrenadante claro en la prueba enzimática en n=2

Ejemplo 17:

Precipitación de polifenoles y antocianinas con ayuda de Gadolinio (III)

5 [0061]

1. presentar 200 µL de vino en recipiente Eppendorf de 2 mL
2. añadir 200 µL de reactivo 1 (0,3 M Tris, pH 9.0)
3. añadir 200 µL de reactivo 2 (0.1 M Gd(NO₃)₃ en agua), agitar y a continuación incubar 5 min. con RT
- 10 4. centrifugar 2 min. a 14000 g y a temperatura ambiente
5. transferir 500 µL de sobrenadante a recipiente nuevo Eppendorf
6. añadir 100 µL de reactivo 3 (0.5 M tampón de fosfato, pH 7.0), agitar y a continuación incubar 5 min. con RT
7. centrifugar 2 min. a 14000 g y a temperatura ambiente
8. introducir 100 µL del sobrenadante claro en la prueba enzimática n=2

15

Ejemplo 18:

Precipitación de polifenoles y antocianinas con ayuda de Disprosio (III)

20 [0062]

9. presentar 200 µL de vino en recipiente Eppendorf de 2 mL
10. añadir 200 µL de reactivo 1 (0,3 M Tris, pH 9.0)
11. añadir 200 µL de reactivo 2 (0.1 M Dy(NO₃)₃ en agua), agitar y a continuación incubar 5 min. con RT
- 25 12. centrifugar 2 min. a 14000 g y a temperatura ambiente
13. transferir 500 µL de sobrenadante a recipiente nuevo Eppendorf
14. añadir 100 µL de reactivo 3 (0.5 M tampón de fosfato, pH 7.0), agitar y a continuación incubar 5 min. con RT
15. centrifugar 2 min. a 14000 g y a temperatura ambiente
16. introducir 100 µL de sobrenadante claro en la prueba enzimática n=2

30

Ejemplo 19:

Precipitación de polifenoles y antocianinas con ayuda de Erblio (III)

35 [0063]

17. presentar 200 µL de vino en recipiente Eppendorf de 2 mL
18. añadir 200 µL de reactivo 1 (0,3 M Tris, pH 9.0)
19. añadir 200 µL de reactivo 2 (0.1 M Er(NO₃)₃ en agua), agitar y a continuación incubar 5 min. con RT
- 40 20. centrifugar 2 min. a 14000 g y temperatura ambiente
21. transferir 500 µL de sobrenadante a recipiente Eppendorf
22. añadir 100 µL de reactivo 3 (0.5 M tampón de fosfato, pH 7.0), agitar y a continuación incubar 5 min. con RT
23. centrifugar 2 min. a 14000 g y temperatura ambiente
24. introducir 100 µL del sobrenadante claro en la prueba enzimática n=2

45

Ejemplo 20:

Precipitación de polifenoles y antocianinas con ayuda de Iterbio (III)

50 [0064]

1. presentar 200 µL de vino en recipiente Eppendorf de 2 mL
2. añadir 200 µL de reactivo 1 (0,3 M Tris, pH 9.0)
3. añadir 200 µL de reactivo 2 (0.1 M Yb(NO₃)₃ en agua), agitar y a continuación incubar 5 min. con RT
4. centrifugar 2 min. a 14000 g y a temperatura ambiente
- 55 5. transferir 500 µL de sobrenadante a recipiente nuevo Eppendorf
6. añadir 100 µL de reactivo 3 (0.5 M tampón de fosfato, pH 7.0), agitar y a continuación incubar 5 min. con RT
7. centrifugar 2 min a 14000 g y a temperatura ambiente
8. introducir 100 µL de sobrenadante claro en la prueba enzimática n=2

60 Leyenda de las figuras

[0065]

65 Figura 1: Comparación entre metodología de referencia HPLC y el método según la invención de una combinación a partir de una precipitación de polifenoles y antocianinas y determinación enzimática sucesiva de la concentración de histamina por medio de 23 vinos tintos diferentes.

Figura 2: Evaluación gráfica de la diluibilidad del extracto. La zona de calibración del ensayo enzimático se encuentra entre 1 y 20 mg/l.

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la preparación de la analítica de muestras de origen biológico, **caracterizado por el hecho de que** la muestra biológica se recoge en un sistema tampón con pH 7 - 10, a continuación se precipitan sustancias interferentes presentes con sales hidrosolubles de lantanios trivalentes, las sales hidrosolubles excedentes de lantanios trivalentes se precipitan y se separan como precipitado y la analítica se realiza con el sobrenadante.
- 10 2. Método según la reivindicación 1 - 2, **caracterizado por el hecho de que** se utiliza como lantano trivalente nitrato de lantano (III) en solución.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 - 2, **caracterizado por el hecho de que** después de la precipitación de las sustancias interferentes, los lantanios en exceso se transfieren a sales difícilmente solubles, preferentemente sulfatos, oxalatos, carbonatos o fosfatos y se separan.
- 20 4. Método según la reivindicación 1 - 3, **caracterizado por el hecho de que** como muestras de origen biológico se usan alimentos, pienso o componentes del cuerpo.
- 25 5. Método según la reivindicación 1 - 4 **caracterizado por el hecho de que** como muestras de origen biológico se usan muestras de vinos en un sistema tampón con pH 7-10, a continuación se precipitan polifenoles y/o antocianinas presentes con sales hidrosolubles de lantanios trivalentes, los lantanios trivalentes en exceso se transfieren a sales difícilmente solubles y se separan y con el sobrenadante se realiza una determinación enzimática del contenido de histamina.
- 30 6. Método según la reivindicación 1 - 5, **caracterizado por el hecho de que** como alimentos se usan bebidas como vino, zumos, cerveza, especies de té o leche, productos lácteos, miel, carne o pescado.
- 35 7. Método según la reivindicación 1 - 6, **caracterizado por el hecho de que** como componentes del cuerpo se usan por ejemplo sangre, tejido, saliva u orina.
8. Uso del método según la reivindicación 1-7 para la eliminación de sustancias interferentes de origen biológico para la preparación de una analítica sucesiva
9. Uso según la reivindicación 8 para la eliminación de polifenoles y/o antocianinas de muestras de vinos.

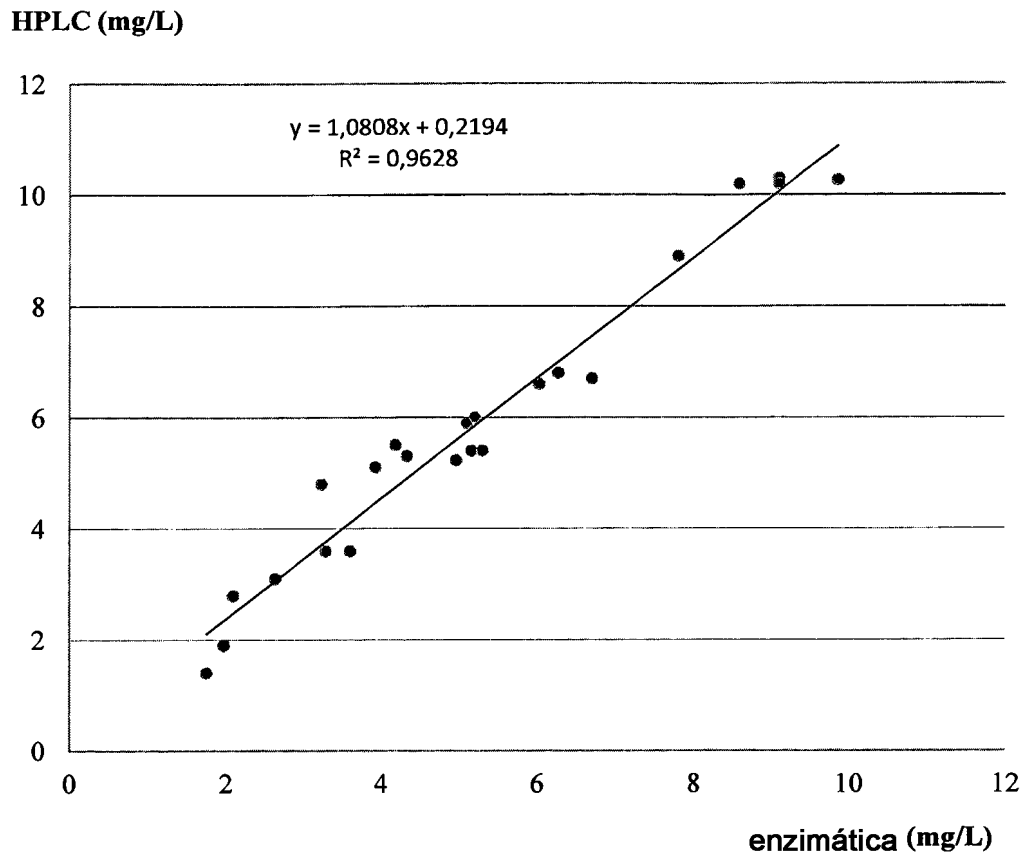


Figura 1

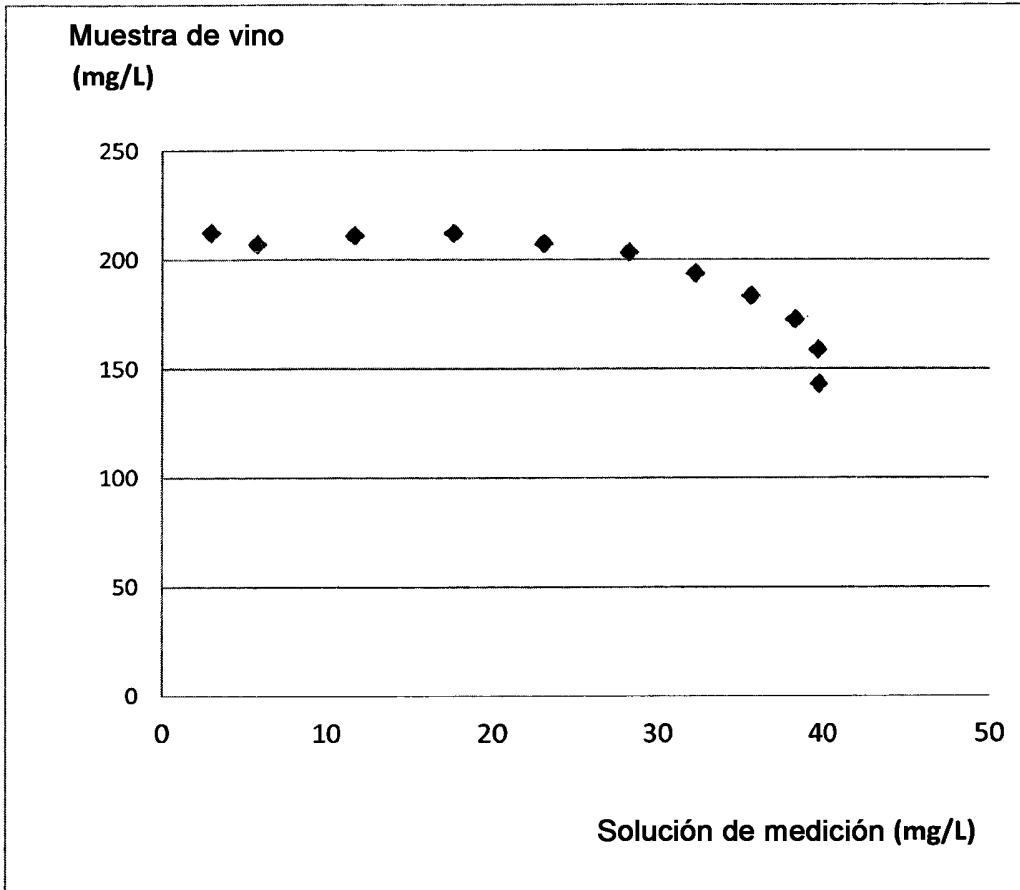


Figura 2